

DERWENT-ACC-NO: 1987-332273

DERWENT-WEEK: 198747

COPYRIGHT 2004 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Nucleic acid determn. device - in  
which electric field strength of electrophoretic carrier  
is lower on negative side of device than at detection part

PATENT-ASSIGNEE: HITACHI LTD[HITA]

PRIORITY-DATA: 1986JP-0082230 (April 11, 1986)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	MAIN-IPC
<u>JP 62239047 A</u>		October 19, 1987	N/A
007	N/A		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
JP 62239047A	N/A	1986JP-
0082230	April 11, 1986	

INT-CL (IPC): G01N027/26, G01N033/50

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 62239047A

BASIC-ABSTRACT:

In a nucleic acid determn. device, a detecting portion is provided in the electrophoretic pass of an electrophoresis device and nucleic acid fragments that successively reach the detecting portion are detected in real time for determg. the base sequence. The electric field strength

of electrophoretic carrier is designed so that it is lower at least at one place on the negative side of the electrophoresis device than that at the detecting portion.

On one of the electrophoresis plates, there are provided a window for detecting fragments of nucleic acid, a partition wall and a slit. An electrophoretic gel consisting of polyacrylamide gel is filled between the two plates. The thickness of the gel becomes smaller at the window when compared with the thickness on the negative side; i.e. the cross-sectional area perpendicular to the gel electrophoretic pass becomes smaller at the detecting portion. As the cross-sectional area of gel becomes smaller, the electric resistance and electric field strength become larger, resulting in higher electrophoretic speed.

ADVANTAGE - Electrophoretic pattern at the detecting portion can be prolonged; so that the resolving power can be enhanced without any redn. in detection sensitivity. Where the distance between two adjacent electrophoretic bands is small, the two bands can be sepd. for detection.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/1

TITLE-TERMS: NUCLEIC ACID DETERMINE DEVICE ELECTRIC FIELD STRENGTH

ELECTROPHORESIS CARRY LOWER NEGATIVE SIDE  
DEVICE DETECT PART

DERWENT-CLASS: A96 B04 D16 J04 S03

CPI-CODES: A04-D04A1; A12-E09; A12-V03C2; B04-B04A1; B04-C03B; B11-C08D1;

B12-K04; D05-H09; J04-B01;

EPI-CODES: S03-E14H;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M424 M740 M750 M903 N102 Q233 Q435 V753

Registry Numbers

87140 1286M

Chemical Indexing M1 \*02\*

Fragmentation Code

H7 H714 H721 J0 J011 J3 J371 M210 M212 M262

M281 M320 M423 M510 M520 M530 M540 M781 M903 M904

N102 P831 Q233 Q435 R022 V743

Specific Compounds

04036U

Registry Numbers

87140 1286M

Chemical Indexing M6 \*03\*

Fragmentation Code

M903 P831 Q233 Q435 R022 R515 R521 R528 R530 R532

R639

Registry Numbers

87140 1286M

POLYMER-MULTIPUNCH-CODES-AND-KEY-SERIALS:

Key Serials: 0231 0619 2512 2706 3277 2743 2768 3288

Multipunch Codes: 014 04- 074 076 086 501 56& 57& 623 627  
643 645 688 722 726

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1987-142059

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1987-248457

PAT-NO: JP362239047A  
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 62239047 A  
TITLE: NUCLEIC ACID BASE SEQUENCE DETERMINING DEVICE  
PUBN-DATE: October 19, 1987

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TOKITA, JIRO	
KAWANAMI, YOSHIMI	
KANBARA, HIDEKI	
SUMIYA, TOMOAKI	
NAGAI, KEIICHI	
SHIMADA, TAMOTSU	
WATABE, KENICHI	
NAKANO, TAKAMORI	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
<u>HITACHI</u> LTD	N/A

APPL-NO: JP61082230  
APPL-DATE: April 11, 1986

INT-CL (IPC): G01N027/26 , G01N033/50

US-CL-CURRENT: 204/618

ABSTRACT:

PURPOSE: To increase the number of base sequences which can be determined by one time of electrophoresis by making the electric field intensity of an electrophoretic carrier higher in a detecting part than in the part of a negative electrode side.

CONSTITUTION: A polyacrylamide of the electrophoretic carrier 6 is packed between electrophoretic plates 1a and 1b. A slit 4 is formed to the detecting part B in the lower part of

the electrophoretic plate 1a and radiation detectors 5a□5d are provided thereto. The detecting part B is constituted thinner than the part A on the negative electrode side in the upper part of the migration part. Buffer cells 7a, 7b are provided above and below the plates 1a, 1b. A negative electrode 8a and a positive electrode 8b are provided and are connected to a DC high-voltage power source 9. A radioisotope label is attached to the mixture composed of nucleic acid fragments and the mixture is subjected to the electrophoresis. The fragments separated by mol.wt. are detected by the detectors 5a□5d. The electric field intensity is made higher by forming the detecting part B of the migration part thinner than the negative electrode side A and therefore, the migration pattern is elongated by the detectors and the resolving power is increased without decreasing the sensitivity.

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-239047

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月19日

G 01 N 27/26  
// G 01 N 33/50C-6923-2G  
P-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 核酸塩基配列決定装置

⑮ 特 願 昭61-82230

⑯ 出 願 昭61(1986)4月11日

⑰ 発 明 者	鴫 田	二 郎	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	川 浪	義 実	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	神 原	秀 記	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社基礎研究所内
⑰ 発 明 者	住 谷	知 明	下松市東豊井794番地	株式会社笠戸工場内
⑰ 発 明 者	永 井	啓 一	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	嶋 田	保	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	渡 部	健 一	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者	中 野	隆 盛	国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地	株式会社中央研究所内
⑰ 出 願 人	株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地			
⑰ 代 理 人	弁理士 中村 純之助			

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

核酸塩基配列決定装置

## 2. 特許請求の範囲

1. 電気泳動装置の泳動路上に検出部を設け、泳動により順次検出部に到達した核酸断片を実時間で検出して核酸の塩基配列を決定する核酸塩基配列決定装置であって、電気泳動担体の電界強度が、検出部より電気泳動装置の負極側の少なくとも1ヶ所で、該検出部より低くなるようにしたことを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

2. 特許請求の範囲第1項に記載の核酸塩基配列決定装置において、電気泳動担体の泳動路に直角な断面積を、検出部より電気泳動装置の負極側の少なくとも1ヶ所で、該検出部より大きくすることにより、該検出部より電気泳動担体の電界強度を低くなるようにしたことを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

3. 特許請求の範囲第2項に記載の核酸塩基配列決定装置において、一部に管径が細い部分を有

するガラス管の内部に電気泳動担体を充填して電気泳動路を形成し、該管径が細い部分に検出部を設けたことを特徴とする核酸塩基配列決定装置。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は核酸の塩基配列決定装置にかかわり、特に、高分解能で核酸断片を検出するのに好適な核酸塩基配列決定装置に関する。

〔従来の技術〕

従来、核酸の塩基配列の決定は、「細胞工学」誌、Vol. 1 (1982) 第79頁から第87頁、および第192頁から第202頁に記載されているように、マキサム-ギルバート法、あるいはダイデオキシ法でラジオアイソトープラベルされた種々の長さの核酸断片を調製し、それをゲル電気泳動法で分子量分離した後、その泳動パターンをオートラジオグラフィで可視化して読みとることにより行われてきた。ゲル電気泳動の担体としては、第5図(a)、(b)に示すような、厚さが均一な平板状のポリアク

リアルアミドゲルが専ら用いられてきた。

しかし、最近では、ジャーナル オブ バイオケミカル アンド バイオフィジカル メソッズ、第10巻、(1984年)、第83頁から第90頁(J. Biochem. Biophys. Methods., Vol. 10, (1984), pp 83-90) に記載されているように、厚さが均一なゲルの代りに、ゲルの厚さに泳動路の終端、すなわち正極側ほど厚くなるような勾配を付けたゲルを用い、泳動路終端付近で泳動パターンを圧縮して、同一ゲル内により広い分子量範囲の核酸断片を展開した例も見られる。第5図(c), (d)にその模様を示す。

〔発明が解決しようとする問題点〕

上記2種類の電気泳動ゲルは、電気泳動終了後にオートラジオグラフィでゲル全面の泳動パターンを読み取る方式(オートラジオグラフィ法)に専ら用いられてきたが、電気泳動部の泳動路上に検出部を設け、泳動により順次検出部に到達した核酸断片を検出して、実時間で泳動パターンを読み取る方式(実時間直接検出法。第1図参照)のことは全く考慮されておらず、以下述べるような問題があった。

・ 3 ・

本発明の目的は、実時間直接検出法を用いた核酸塩基配列決定装置であって、検出感度を損うことなく核酸断片の検出を高分解能化し、より長い核酸断片を分離検出できるようにして、一度の電気泳動で決定できる塩基配列数を増すことのできる装置を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的は、検出部において電気泳動パターンを引き伸ばし、相隣り合った2つの泳動帯の間隔を広げることによって、達成される。

このため、本発明では、電気泳動担体の電界強度が、検出部より負極側の部分よりも、検出部で高くなるようにすることによって、電気泳動パターンを引き伸ばしている。

また、上記の高い電界強度は、電気泳動担体の泳動路に直角な断面積を、検出部で小さくすることによって、実現できる。

〔作用〕

電気泳動ゲルの電気抵抗はゲルの断面積に逆比例する。また、同一ゲル中では各部で同一の電流

一般に、ゲル電気泳動では、核酸断片の長さが長くなると、一塩基分だけ長さの異なった核酸断片の泳動帯の間隔が狭くなる。一方、核酸断片を検出するには $\beta$ 線のカウント数のある程度以上集める必要があるため、無闇にスリット幅を狭め、 $\beta$ 線を有効に検出できる立体角を小さくして検出感度を低下させることはできない。従って、第5図(a), (b)に示したような従来の厚さが均一なゲルを用いた場合は、核酸断片の長さが長くなると、スリット中に同時に2つ以上の泳動帯が入るようになり、各泳動帯を分離して検出できないという問題があった(第2図(a), (b)参照)。また、第5図(c), (d)に示したような、ゲルの厚さを泳動路の終端すなわち正極側ほど厚くしたゲルでは、オートラジオグラフィ法を用いる場合には、1枚のゲルでより多くの塩基配列が決定できるというメリットがあるが、実時間直接検出法を用いた場合には、相隣り合った泳動帯の間隔がかえって狭くなり、長い核酸断片を分離して検出するのがより困難になってしまうという問題があった。

・ 4 ・

が流れるから、ゲル中の電界強度は電気抵抗に比例し、さらに、泳動速度は電界強度に比例する。従って、ゲルの断面積が小さいほど電気抵抗、電界強度が大きくなり、泳動速度が早くなる。そこで、同一ゲル中の各部でゲルの断面積を変化させてやれば、泳動速度を制御できるため、各部の泳動パターンを伸縮することができる。

本発明では、泳動路に直角なゲルの断面積を、検出部より負極側の部分に比べて検出部で小さくするようにしてあり、この部分で電界強度が大きくなり泳動速度が速くなるので、泳動パターンを引き伸ばすことができ、相隣り合った2つの泳動帯の間隔を広げることができる。

以上の構成の結果、実際にスリット幅を狭めなくても、スリット幅は泳動パターンに対して相対的に狭くなり、検出感度を低下させることなく分解能を高めることができる。

〔実施例〕

以下、本発明の一実施例を図面を用いて説明する。第1図(a), (b)に該実施例の装置のそれぞれ縦

断面図および正面図を示す。図において、2枚の電気泳動板 1a, 1b の片方あるいは両方には(図は片方の場合を示す)、核酸断片検出用の窓 2 と隔壁 3 およびスリット 4 が設けられ、さらにその上に、4種類の核酸塩基ごとの放射線検出器 5a ~ 5d が設置されている。2枚の電気泳動板 1a, 1b の間には、電気泳動担体であるポリアクリルアミドゲルからなる電気泳動ゲル 6 が充填されているが、その厚さを、検出部より負極側の部分に比べて検出部で薄くして、ゲルの泳動路に直角な断面積を小さくしてある。なお、このような電気泳動ゲルは、2枚の電気泳動板と、その間隔を決めるスペーサとを目的の形状に加工し、その間にアクリルアミドモノマーを注入し、これを重合させることにより作ることができる。電気泳動板 1a, 1b の上・下端には、それぞれバッファ槽 7a, 7b と、負極 8a および正極 8b が設置され、また2つの電極の間には直流高圧電源 9 が接続されて、垂直型電気泳動装置を構成している。放射線検出器 5a ~ 5d の各出力は信号処理装置 10 に入力して処理され、

さらに出力装置 11 によって出力されるようになっている。

次に、本実施例の動作を説明する。まず、マキサム-ギルバート法あるいはダイデオキシ法で調製した  $^{32}\text{P}$  によってラジオアイソトープラベルされた種々の長さの核酸断片混合物を、ゲル上端に設けたウェル 12a ~ 12d に、4種類の核酸塩基ごとに注入する。続いて、直流高圧電源 9 により直流電圧(約  $50\text{ V/cm}$ )を負極 8a と正極 8b との間に印加すると、核酸断片は電気泳動され、分子量分離され、同じ長さの核酸断片は泳動帯 13 を形成する。そして、短い核酸断片ほど泳動速度が速いので、短い核酸断片の泳動帯から順に放射線検出器 5a ~ 5d の前に到達し、 $^{32}\text{P}$  から発せられた  $\beta$  線が検出器により検出される。相隣り合った泳動帯は、スリット 4 により分離して検出される。検出器から出力される信号は信号処理装置 10 に送られ、4種類の塩基のうち、どの塩基に対応する検出器からの信号であるかを加味して処理され、電気泳動パターンが読み取られる。このように、

・ 7 ・

本実施例の装置では、電気泳動中に実時間で、写真フィルムなどを使うことなく、直接に電気泳動パターンを読み取ることができ、塩基配列を決定することができる。

ところで、前述のように、検出される核酸断片の長さが長くなると、相隣り合った泳動帯、すなわち1塩基分だけ長さが異なった核酸断片のつくる泳動帯同志の間隔は狭くなるという性質がある。一方、核酸断片を検出するには  $\beta$  線のカウント数がある程度以上集める必要があるため、無闇にスリット幅を狭めて、 $\beta$  線を有効に検出できる立体角を小さくすることはできない。従って、従来の厚さが均一なゲルを用いた場合、検出される核酸断片の長さが 100 ~ 150 塩基長程度になると、スリットの前のゲル中に同時に2つ以上の泳動帯が入るようになり、各泳動帯を分離して検出できなくなってしまうという問題があった。(第2図(a), (b)参照)そこで、本実施例では、ゲルの厚さを検出部より負極側の部分に比べて検出部で薄くし、具体的にはウェル部が 1.0 mm であるのに対し検出

・ 8 ・

部を 0.5 mm として、泳動路 14 に直角なゲルの断面積を小さくしてある。その結果、検出部でゲルの電気抵抗が大きくなるため、一定の電流が流れている状態では電界強度が増し、泳動速度が速くなって、泳動パターンが引き伸ばされる。従って、実際にスリット幅を狭めることなく、スリット幅を泳動パターンに対して相対的に狭くできるため、検出感度を損なわずに分解能を上げることができる(第2図(c), (d)参照)。

なお、ゲルの形状としては、第1図に示したものの以外に、例えば第3図(a)~(c)に示したもののでも、同様の効果が得られる。特に検出部よりも泳動路の正極側のゲルの形状は、上記の効果に直接影響を及ぼさない。

次に、本発明のもう一つの実施例を説明する。第4図(a), (b)に該実施例の装置のそれぞれ縦断面図および正面図を示す。図において、ガラス管 15 には、その一部に管径が細い部分が設けられている。また、この部分のガラスの肉厚は  $^{32}\text{P}$  からの  $\beta$  線が十分透過できるように薄くして、ここを検



出窓として用いる。このガラス管15は4種類の核酸塩基ごとに設けられ、上記検出窓となる部分の周囲には、それぞれリング状のスリット4と放射線検出器5a～5dが配されている。それぞれのガラス管15の内部には、電気泳動ゲル6となるポリアクリルアミドゲルが充填されているが、ガラス管15の管径が、検出部より負極側の部分（内径3mm）に比べて検出部で細い（内径2mm）ため、検出部では泳動路14に直角なゲルの断面積が小さくなっている。ガラス管15の上端および下端には、それぞれバッファ槽7a、7bと、負極8aおよび正極8bが設置され、2つの電極の間には直流高圧電源9が接続されている。放射線検出器5a～5dの出力は信号処理装置10に入力して処理され、さらに出力装置11によって出力されるようになっている。

本実施例の動作は前記実施例とほぼ同じである。ただし、本実施例では、種々の長さの核酸断片の混合物は、ウェルではなく各ガラス管中のゲルの上端に重層する。また、本実施例の場合は、 $\beta$ 線の

の検出は円柱状のゲルの全周から行われるので、平板状のゲルの片面あるいは両面から検出を行う前記実施例に比べて $\beta$ 線検出の立体角が大きくなり、それぞれ2倍強、1倍強の $\beta$ 線カウント数が得られる。従って、本実施例によれば、前記実施例と同様に検出感度を損なうことなく分解能を上げられることに加えて、検出感度を高くすることができる。また、ガラス管を引き伸ばすことにより容易に $\beta$ 線検出窓を作れるという長所がある。  
〔発明の効果〕

本発明によれば、検出部における泳動パターンを引き伸ばすことができるので、実際にスリット幅を狭めなくても、スリット幅は泳動パターンに対して相対的に狭くなるので、検出感度を低下させることなく分解能を上げることができる。

従って、検出すべき核酸断片が長くなって、相隣り合った2つの泳動帯の間隔が小さくなっても、2つの泳動帯を分離して検出できるので、一度の電気泳動で決定できる塩基配列数を増すことができる。

・ 11 ・

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図(a), (b)は本発明の一実施例の装置を示すそれぞれ縦断面図および正面図、第2図(a), (b)は従来の厚さが均一なゲルを用いた場合のそれぞれ電気泳動担体を示す縦断面図および検出器の出力例を示す図、第2図(c), (d)は前記実施例の場合のそれぞれ電気泳動担体を示す縦断面図および検出器の出力例を示す図、第3図(a), (b), (c)はいずれも前記実施例の変形例を示す縦断面図、第4図(a), (b)は本発明の他の実施例の装置を示すそれぞれ縦断面図および正面図、第5図(a)と(b)、および(c)と(d)はそれぞれ従来の電気泳動ゲルを示す縦断面図および泳動パターンを示す図である。

符号の説明

- 1a, 1b…電気泳動板
- 4…スリット
- 5a～5d…放射線検出器
- 6…電気泳動ゲル
- 7a, 7b…バッファ槽
- 8a…負極

・ 13 ・

・ 12 ・

- 8b…正極
- 9…直流高圧電源
- 10…信号処理装置
- 11…出力装置
- 12a～12d…ウェル
- 13…泳動帯
- 14…泳動路
- 15…ガラス管

代理人弁理士 中村純之助

図 2

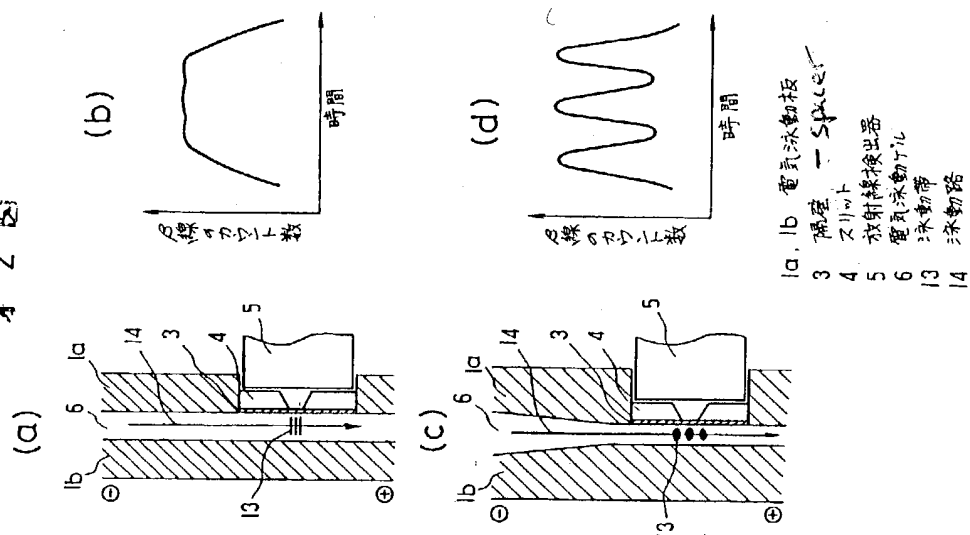


図 1

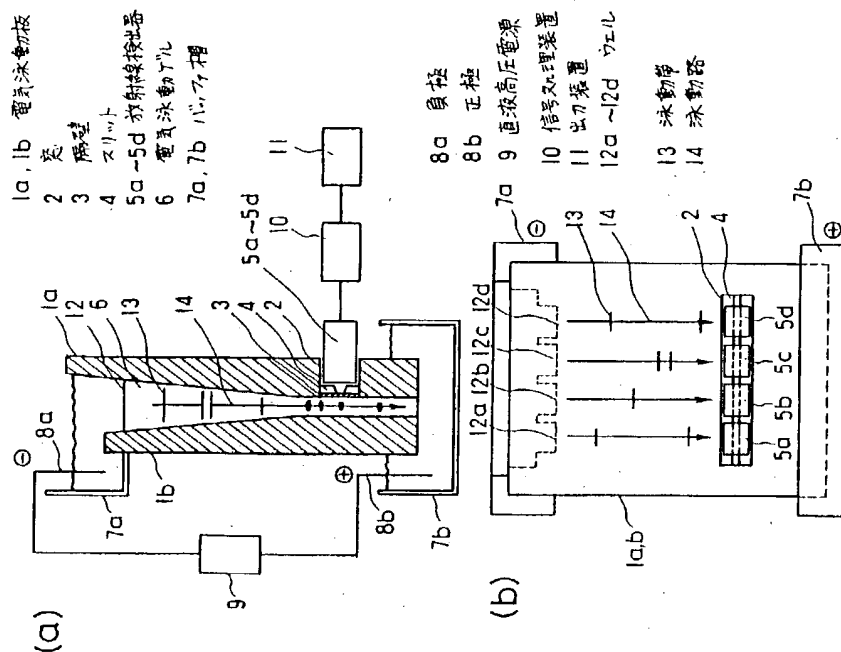


図 3

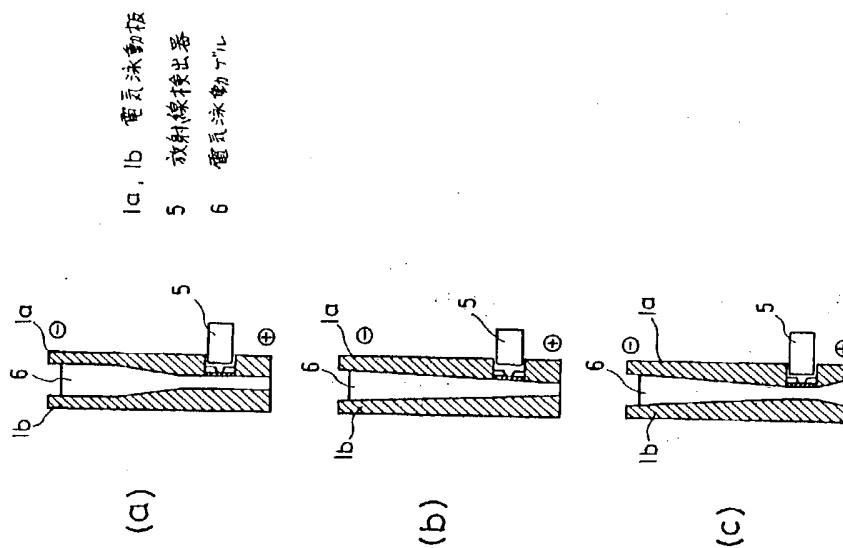


図 4

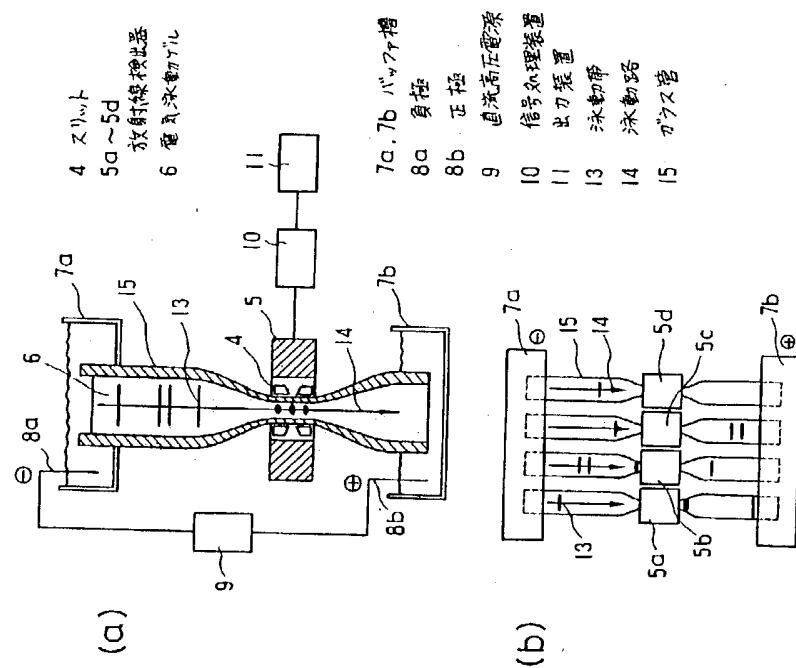
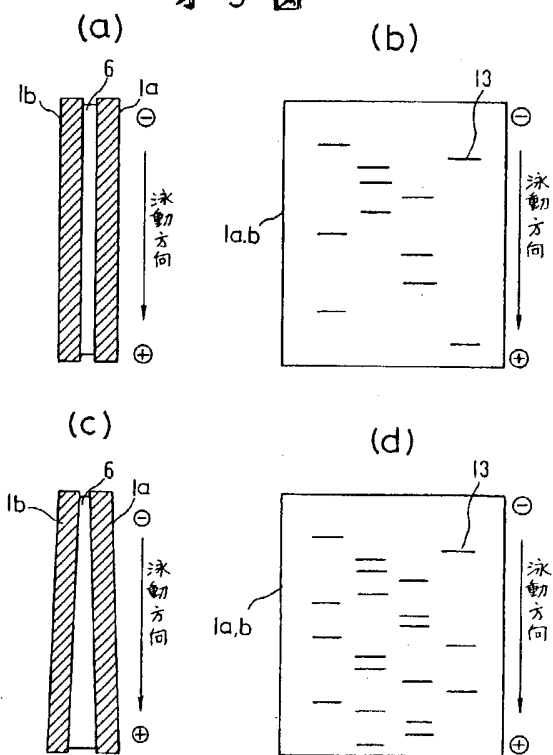


図 5



1a, 1b 電気泳動板  
6 電気泳動ゲル  
13 泳動帯